



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

BEST AVAILABLE COPY

(19) SU (11) 1664845 A1

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

(51)5 C 12 P 21/00

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

ВСЕСОЮЗНАЯ
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ
БИБЛИОТЕКА

1

(89) DD 257174 (48) 08.06.88

(21) 7774327/13

(22) 03.11.86

(31) WPC 12 P/284889

(32) 20.12.85

(33) DD

(46) 23.07.91. Бюл. № 27

(71) Научный центр по биотехнологии (DD).
Всесоюзный научно-исследовательский ин-
ститут генетики и селекции промышленных
микроорганизмов(SU)

(72) Ульрих Корн (DD), А.Л. Остерман,
В.М. Степанов, Т.Л. Воюшина, Л.А. Люб-
линская (SU), Райнер Грунов (DD)

(53) 668.392 (088.8)

2

(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕПТИДОВ

(57) Изобретение относится к способу пол-
учения пептидов, особенно Z-Ala-Ala-Leu-p-
нитроанилида и Z-L-Asp-L-Phe OMe
(аспартама) в присутствии металлопротеи-
наз. Цель изобретения - повышение выхода
трипептидов (Z-аспартама). Способ заклю-
чается в связывании Z-Ala-Ala с Leu-p-нитро-
анилидом и Z-L-Asp с L-PheOMe-HCl в
присутствии протеиназы из *Bacillus cereus*
ZIMET 10700. Металлопротеиназу использу-
ют в виде фильтрата культуральной
жидкости или очищенного аффинной хрома-
тографией с бацитрацин-силохромом.
1 з.п.ф-лы.

Изобретение относится к способу по-
лучению пептидов, особенно Z-Ala-Ala-
Leu-p-нитроанилида и Z-L-Asp-L-PheOMe
(аспартама), в присутствии металлопротеи-
наз.

Из обзора ISOWA, V. Vuki Casei Kagaku
Kyska alshi, 36, 1978, 195-20 известен спо-
соб получения пептидов с использованием
протеиназ в качестве катализаторов.
При этом используются серинпротеи-
назы и металлопротеиназы разного би-
ологического происхождения из
Bacillus polymyxa, *Bacillus subtilis*,
Bacillus thermoproteolyticus и др.

Недостатком данного способа является
то, что эти ферменты требуют глубокой очи-
стки.

Из описания патента ФРГ № 3203292,
кл. С 12 P 21/00, опублик 1985 известен
способ получения пептидов путем связыва-
ния Z-Ala-Ala с Leu-p-нитроанилидом и Z-L-

Asp с Zthe-ome-HCl в присутствии металло-
протеиназы.

Недостатком этого способа является то,
что при этом образуется незначительное ко-
личество трипептидов.

Целью изобретения является повыше-
ние выхода целевых продуктов.

Металлопротеиназа из *B. cereus* ZIMET
10700 применяется для получения пептида
Z-Ala-Ala-Leu-p-нитроанилида или пептида
Z-L-Asp-L-PheOMe. при этом установлено,
что этот фермент можно использовать также
в виде фильтрата культуральной жидкости
или очищенного аффинной хроматографией
с бацитрацин-силохромом.

Эффективность синтеза выше, если
применяется очищенный фермент. Дейст-
венным методом очистки для металлопроте-
иназы из *Bac. cereus* ZIMET 10700 является
аффинная хроматография с бацитрацин-си-
лохромом. В результате очистки получают

(19) SU (11) 1664845 A1

фермент, почти свободный от углеводов и чужих протеинов. Этот фермент позволяет повысить скорость реакции и выход конечного продукта.

Пример 1. 74 мг Z-Ala-Ala и 62 мг Leu-p-нитроанилида растворяют в 250 мкл диметилформамида и смешивают с 500 мкл 50 mM трис-HCl, pH 7,5, с 1 mM Ca-ацетата, при 35°C и добавляют 180 мкл фильтрата культуральной жидкости из *Bac. cereus* ZIMET 10700, содержащего 140 мкг фермента. Концентрация субстратов при этом составляет по 200 мкмоль. При перемешивании в течение 25 ч при 35°C получено 51% продукта. Качественный анализ конечного продукта проводят тонкослойной хроматографией на силикагельных пластинках в системе н-бутанол : пиридин : уксусная кислота : вода в соотношении 10:15:3:12, а детектирование в ультрафиолетовом свете после обработки нингидрином и с помощью КJ после хлорирования. Кроме этого, для качественного и количественного определения конечного продукта применяют HPLC. Детектирование проводят у абсорбционного максимума p-нитроанилина (315 нм) после отделения субстрата от продукта в C₁₈-колонке в ацетонитрильном градиенте. Дополнительно определяют выход Z-Ala-Ala-Leu-p-нитроанилида гравиметрическим методом после повторной промывки NaHCO₃ и водой.

Пример 2. 74 мг Z-Ala-Ala и 62 мг Leu-p-нитроанилида растворяют в 250 мкл диметилформамида и смешивают с 300 мкл 50 mM трис-HCl, pH 7,5, с 1 mM Ca-ацетата. Общий объем составляет 900 мкл, а концентрация субстратов по 250 мкмоль. После чего доводят температуру до 35°C, добавляют 10 мкг фермента из *Bac. cereus* ZIMET 10700, очищенного аффинной хроматографией, и перемешивают 18 ч при 35°C. Выход Z-Ala-Ala-Leu-p-нитроанилида составляет 72%.

Пример 3. 24,4 мг Z-Asp растворяют в 30 мкл 6 н. NaOH и 42,2 мг PheOMe-HCl, растворяют в 200 мкл диметилформамида и смешивают с 300 мкл 50 mM трис-HCl, pH

7,5, с 1 mM Ca-ацетата. После нагрева до 35°C добавляют 100 мкл фильтрата культуральной жидкости, содержащего 110 мкг фермента. После перемешивания в течение 24 ч выход составляет 38%. Качественное и количественное определение Z-аспартама соответствует методу примера 1, причем детектирование разделенного HPLC продукта проводят у 220 нм.

Пример 4. 122 мг Z-Asp растворяют в 160 мкл 6 н. NaOH и 211 мг PheOMe-HCl в 800 мкл 50 mM трис-HCl, pH 7,5, с 1 mM Ca-ацетата. После нагрева до 35°C добавляют 1 мг фермента, очищенного аффинной хроматографией, в 100 мкл 50 mM трис-HCl, pH 7,5, с 1 mM Ca-ацетата. В результате перемешивания в течение 24 ч получают выход Z-аспартама 54%.

Пример 5. Способ осуществляют как в примере 4, причем четвертое количество реактандов растворяют в 2,5 мл 50 mM трис-HCl-ном буфере, pH 7,0, с 1,0 mM Ca-ацетата. После повышения температуры до 35°C добавляют 3 мг фермента, очищенного аффинной хроматографией. Через 5 ч перемешивания твердый осадок удаляют центрифугированием, а надосадочную жидкость снова инкубируют. Образующийся в течение следующих 5 ч осадок опять центрифугируют и определяют количество Z-аспартама. Общий выход составляет 85%.

Формула изобретения

1. Способ получения пептидов Z-Ala-Ala-Leu-p-нитроанилида или Z-L-Asp-PheOMe путем связывания Z-Ala-Ala с Leu-p-нитроанилидом или соответственно Z-L-Asp с L-PheOMe-HCl в присутствии металлопротеиназы из *Bacillus cereus*, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевых продуктов, используют металлопротеиназу из *Bacillus cereus* ZIMET 10700.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что, металлопротеиназу используют в виде фильтрата культуральной жидкости или очищенную аффинной хроматографией с бацитрацин-силохромом.

Редактор Н.Рогоulich

Составитель А.Ульянова
Техред М.Моргентал

Корректор М.Кучерявая

Заказ 2366

Тираж 362

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул.Гагарина, 101

BEST AVAILABLE COPY

Dialog

Prodn. of peptide(s) having P-nitro-anilide and methoxy terminal gps. - by coupling reactions using metalloprotease from Bacillus Cereus Zimet 10700

Patent Assignee: VE FORSCH BIOTECHN; BIOTECH RES CENTRE; GENETICS SELECTION IND RES INST

Inventors: GRUNOW R; KORN U; LJUBLINSKA L; OSTERMAN A; STEPANOV V; WOJUSCHINA T; OSTERMAN A L; STEPANOV V M

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DD 257174	A	19880608	DD 284889	A	19851220	198842	B
SU 1664845	A1	19910723	SU 7774327	A	19861103	199226	

Priority Applications (Number Kind Date): DD 284889 A (19851220)

Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DD 257174	A		3		
SU 1664845	A1		2	C12P-021/00	CMEA No patent DD 257174

Abstract:

DD 257174 A

In a new process for the prodn. of the peptide Z-Ala-Ala-Leu-p-nitro-anilide by coupling Z-Ala-Ala with Leu-p-nitro-anilide or of Z-Asp-Phe-OMe by coupling of Z-L-Asp with L-Phe-OMe-HCl using a metalloprotease, the metalloprot is that produced by Bacillus cereus ZIMET 10700.

USE/ADVANTAGE - Z-Ala-Ala-Leu-p-nitroanilide is useful as a chromogenic substrate for analytical purposes. Z-A Ph-OMe is useful as an intermediate for the sweetening agent L-Asp-Phe-OMe. The enzyme can be obtained from microorganism culture filtrates in sufficient purity for the peptide coupling after a single-pass affinity chromatography (pref. with bacitracin-silochrome).

Derwent World Patents Index

© 2005 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 7659651